

EXHIBIT 2

Immunisierung NTC + 8h P₂₀A₃₃₃
 ↳ BALB/c

BALB/c ♀ v. Peter geloren: ⇒ Alte: 12 Wochen

Zellen: buffy coat #351 ($\Delta T_{red 1}$) v. : $165 \cdot 10^6$
 ↓ Nylonvoll-Säule
 $80 \cdot 10^6$ in 50 ml R10F⁻

Stimulation: 108 μ l PMA (5000x)
 + 18 μ l A23187 (3000x)
 ad 4 ml R10F⁻
 + 50 ml Zellsuspension
 54 ml PMA 2000x/ml
 A23187 333x/ml

$11 \cdot 10^6$
 ↓ 6h
 FAC₃-Analyse: 95% OKT3⁺
 64% TRAP⁺ gut ⊕
 87% CD69⁺ gut ⊕

Immunisierung nach 10h Stimulation

↳ je $5 \cdot 10^6$ Zellen in 200 μ l PBS ohne Adj. i.p.

5 Mäuse
 1 Kontrolle ungeimpft

1. boost

Zellen: w.o. (2. Aliquot) : $180 \cdot 10^6$ 6% tot

↓ Nylon

$78 \cdot 10^6$ in 45 ml R10F⁻ (Säule
 eluierte von
 Layson)

Stimulation: 12h PMA (2000x/ml)
 A23187 (333x/ml) > gleiche Aliquots w.o.

↓
 FAC₃: 47% TRAP⁺
 89% CD3⁺ (Modulation?)

$50 \cdot 10^6$ blend 10% tot

↳ Immunisierung: $5 \cdot 10^6$ i.p. 200 μ l PBS ohne Adj.

Immunisierung NTC + 8 h P₂₀A₃₃₃

-> BALB/c

: BALB/c ♀ v. Petra geboren: ⇒ Alter: 12 Wochen

Zellen: buffy coat 9951 (Δ Fach 1) v.

165×10⁶

↓ Nylonwoll-Säule

80×10⁶ in 50 ml R10F⁻

Stimulation:

10,8 µl PMA (5000×)

+ 18 µl A23187 (3000×)

ad 4 ml R10F⁻

+ 50 ml Zellsuspension

11:10

54 ml PMA 20 ng/ml

↓ 6 h

A23187 333 ng/ml

FACS-Analyse: 95% OKT3⁺

64% TRAP gut +

87% CD69 gut +

Immunisierung nach 10 h Stimulation

-> je 5×10⁶ Zellen in 200 µl PBS ohne Adj. i.p.

5 Mäuse

1 Kontrolle ungespritzt

1. boost

Zellen: w.o. (2. Aliquot):

180×10⁶

6% tot

↓ Nylon

78×10⁶ in 45 ml R10F⁻

Säule

eluierte sehr
langsam

Stimulation: 12 h PMA (20 ng/ml)

A23187 (333 ng/ml) gleiche Aliquots wie oben

↓ FACS: 47% TRAP⁺

89% CD3⁺ (Modulation?)

50×10⁶ lebend, 10% tot

↓ Immunisierung: 5×10⁶ i.p. 200 µl PBS ohne
Adjuv.

Immunization NTC + 8 h P₂₀A₃₃₃

-> BALB/c

BALB/c ♀ from Petra born:

⇒ age: 12 weeks

cells: buffy coat 9951 (Δ box 1) from

: 165×10⁶

↓ Nylonwool-column

80×10⁶ in 50 ml R10F

Stimulation:

10,8 μl PMA (5,000×)

+ 18 μl A23187 (3,000×)

ad 4 ml R10F-

+ 50 ml cell suspension

11:10 a.m.

54 ml PMA 20 ng/ml

↓ 6 h

A23187 333 ng/ml

FACS-analysis: 95% OKT3⁺

64% TRAP well +

87% CD69 well +

Immunization after 10 h stimulation

-> 5×10⁶ cells each in 200 μl PBS w/o adjuvant i.p. 5 mice

1 control not injected

1st boost

cells: see above (2nd aliquot): 180×10⁶ 6% dead

↓ Nylon

78×10⁶ in 45 ml R10F-

column

eluted very

slowly

Stimulation: 12 h PMA (20 ng/ml)

A23187 (333 ng/ml) same aliquots as above

↓ FACS: 47% TRAP⁺

89% CD3⁺ (modulation?)

50×10⁶ live, 10% dead

↓ immunization: 5×10⁶ i.p. 200 μl PBS w/o

adjuvant